蛇含委陵菜的化学成分及抗炎活性研究

张宝¹, 刘佳¹, 匡维米^{2,3}, 蒋礼², 李勇军², 李悦^{1*}

(1. 贵阳市妇幼保健院/贵阳市儿童医院 药学部,贵阳 550003; 2. 贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室,贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 药学院,贵阳 550025)

摘要: 为了研究蛇含委陵菜(Potentilla kleiniana)的化学成分及其抗炎活性,该文利用 D-101 大孔树脂、硅胶及 Toyopearl HW-40F 等色谱技术对蛇含委陵菜 60%乙醇提取物进行分离纯化,通过核磁共振波谱(NMR)、高分辨质谱(HR-ESI-MS)鉴定化合物的结构,采用小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)体外炎症模型评价化合物的抗炎活性。结果表明: (1)从蛇含委陵菜中分离得到 15 个化合物,分别鉴定为 2-(heptadecanoyloxy)propane-1,3-diyl distearate (1)、9,12,13-三羟基-10,15-十八二烯酸(2)、9,12,13-三羟基-10,15-十八二烯酸甲酯(3)、2,2′-氧代双(1,4-二叔丁苯)(4)、大黄素(5)、大黄酚(6)、(6R,9R)-3-酮-α-紫罗兰醇-9-O- β -D-吡喃葡萄糖苷(7)、新穿心莲内酯(8)、甲基- α -D-呋喃果糖苷(9)、1-O- β -D-吡喃果糖- α -D-吡喃阿洛糖苷(10)、对香豆酸(11)、cesternosides A(12)、koaburaside(13)、荭草素(14)、异荭草素(15),均首次从委陵菜属植物中分离得到。(2)抗炎实验结果显示,化合物 1-3、8、11-15 具有一定的 NO 释放抑制活性,其中化合物 8 在 25 μ mol·L-1浓度下抑制率为 72.5%。该研究丰富了蛇含委陵菜的植物化学信息,明确了脂肪酸衍生物、酚性成分及二萜类成分是其抗炎活性成分,为蛇含委陵菜的进一步开发利用提供理论依据。

关键词:蛇含委陵菜,化学成分,分离纯化,结构鉴定,抗炎活性

中图分类号: Q946

文献标识码: A

Chemical constituents from Potentilla kleiniana and their

anti-inflammatory activity

ZHANG Bao¹, LIU Jia¹, KUANG Weimi^{2,3}, JIANG Li², LI Yongjun², LI Yue^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Guiyang Maternal and Child Healthcare Hospital & Guiyang Children's Hospita, Guiyang 550003, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 3. College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The purpose of this paper is to investigate the chemical constituents of *Potentilla kleiniana* and their anti-inflammatory activity. The 60% ethanol extract of *P. kleiniana* were isolated by D-101 macroporous adsorptive resins, silica gel, Toyopearl HW-40F and other methods, and their chemical structures were elucidated on the basis of NMR and HR-ESI-MS analysis. Meanwhile, the anti-inflammatory activity of the compounds was evaluated by mouse macrophage (RAW 264.7) inflammatory model induced by lipopolysaccharide (LPS) *in vitro*. The results were as follows: (1) Fifteen compounds were isolated and identified from *P. kleiniana* as 2-(heptadecanoyloxy)propane-1,3-diyl distearate (1), 9,12,13-trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid

基金项目: 贵州省中医药、民族医药科学技术研究专项(QZYY-2021-176); 贵州省高层次创新人才培养计划项目(20165677)[Supported by Traditional Chinese Medicine, Ethnic Medicine Science and Technology Research Special Project of Guizhou Province (QZYY-2021-176); High-level Innovative Talents Training Program of Guizhou Province (20165677)]。

第一作者: 张宝(1993-),硕士,主管药师,主要从事中药药效物质基础及质量控制研究,(E-mail)1004800340@qq.com。

^{*}通信作者: 李悦,硕士,副主任药师,主要从事中药药效物质基础及药理学研究,(E-mail)liyue 0407@163.com。

(2), methyl-9,12,13-trihydroxyoctadeca-10,15-dienoate (3), 2,2'-oxybis(1,4-di-tert-butylbenzene) (4), emodin (5), chrysophanol (6), (6R,9R)-3-oxo-α-ionol-9-O-β-D-glucopyranoside (7), neo-andrographolide (8), methyl-α-D-fructofuranosides (9), 1-O-β-D-fructofuranosyl-α-D-allopyranos (10), p-coumaric acid (11), cesternosides A (12), koaburaside (13), orientin (14), isoorientin (15). Compounds 1-15 were obtained from Potentilla genus for the first time. (2) The anti-inflammatory test results showed that compounds 1-3, 8, and 11-15 had moderate inhibitory activities on NO production, and the inhibition rate of 8 was 72.5% at the concentrations of 25 μmol·L⁻¹. In conclusion, the study enriches the phytochemical information of P. kleiniana, and clarifies that fatty acid derivatives, phenolic components and diterpenoids are anti-inflammatory active components, which provide a theoretical basis for further exploitation of P. kleiniana.

Key words: Potentilla kleiniana, chemical constituents, isolation and purification, structural identification, anti-inflammatory activity

蛇含委陵菜(Potentilla kleiniana)为蔷薇科委陵菜属一年生、二年生或多年生宿根草本植物,又名五匹风、五皮风、地五甲、五爪龙等,在我国主要分布于广西、贵州、云南、四川等地(中国科学院中国植物志编辑委员会,1985;贵州省中药材、民族药材质量标准编审委员会,2003)。蛇含委陵菜味苦、性微寒,归肝、肺经,具有祛风止咳、搜风剔邪、清热解毒等功效,在贵州省苗族、布依族及侗族等少数民族地区常用于治疗肺炎、风湿关节炎等炎性疾病(罗迎春和孙庆文,2013)。目前对蛇含委陵菜的化学成分及生物活性鲜有研究,已报道的化学成分主要包括三萜类和黄酮类(黄易安,2008;李胜华等,2011),生物活性侧重于提取物的抗菌、抗炎、降糖活性筛选(李胜华等,2014;张晨光等,2018;Liu et al., 2019),其抗炎物质基础不明确。为了进一步丰富该药用植物的化学成分信息,明确其抗炎活性物质,促进其开发利用,本研究以黔产蛇含委陵菜全株为研究对象,采用现代色谱分离技术、光谱学手段及药理学方法,拟探讨: (1)蛇含委陵菜 60%乙醇提取物的化学成分; (2)分离得到的化合物的体外抗炎活性。

1 材料与仪器

1.1 材料

蛇含委陵菜药材采自贵州省贵阳市花溪区高坡乡,经贵州医科大学刘春花副教授鉴定为蔷薇科植物蛇含委陵菜(*Potentilla kleiniana*)全草(图 1)。标本保存于贵州医科大学贵州省药物制剂重点实验室,凭证号为 NO.20210416。

1.2 仪器

高分辨质谱仪(Theemo Fisher Q Exactive-Plus 四级杆-静电场轨道肼,Theemo Fisher Scientific 公司,美国);核磁共振波谱仪(Bruker AV-600 型,Bruker 公司,德国;JEOL-ECS-400 MHz 型,JEOL,日本);旋转蒸发仪(BUCHIR-300 型,BUCHI 公司,瑞士);超纯水机(KZ-20L 型,上海科制环保设备有限公司);MCI(CHP20/P120,三菱公司,日本);D-101 大孔树脂(天津市海光化工有限公司);柱层析硅胶及硅胶 GF₂₅₄预制板(青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20(Pharmacia Biotech 公司,瑞士);Toyopearl HW 40F(JEOL,日本);电热恒温培养箱(DHP-9052 型,上海一恒科学仪器有限公司)。

1.3 试剂

DMEM 高糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco 公司,美国); CCK-8 试剂盒(Glpbio 公司,美国); NO 试剂盒(南京建成生物工程研究所); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(北京索莱宝科技有限公司); 地塞米松(上海甄准生物科技有限公司); 小鼠巨噬细胞 RAW 264.7(美国模式培养物集存库,美国)。其余化学试剂均

为分析纯。



Fig.1 The sample of *Potentilla kleiniana*

2 实验方法

2.1 提取与分离

取蛇含委陵菜干燥全草 15 kg,粉碎后用乙醇-水(60:40,V/V)回流提取 3 次(2、1.5、1.5 h),提取液合并后减压浓缩至浸膏(2.1 kg)。浸膏加入适量蒸馏水,超声震荡分散,经 D-101 大孔树脂,用乙醇-水(0:100,50:50,95:5,V/V)洗脱,收集各部分洗脱液,减压浓缩。其中 50%乙醇部位(428 g)经正相硅胶柱层析(硅胶:200~300 目;洗脱剂:氯仿-甲醇 50:1~1:1,V/V)洗脱,得到 9 个组分(Fr.A~I)。

Fr.B 减压浓缩并放至室温后析出少量难溶性粉末状沉淀,过滤沉淀备用,滤液经正相 硅胶柱层析(硅胶: $300\sim400$ 目; 洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 100:1,V/V)得到 Fr.B1 \sim B3。 Fr.B3 经正相硅胶柱层析(硅胶: $300\sim400$ 目; 洗脱剂: 石油醚-丙酮 20:1,V/V)得到 Fr.B3.1 \sim 3.6。Fr.B3.6 依次经过 Sephadex LH-20(二氯甲烷-甲醇 1:1,V/V)、正相硅胶(硅胶: $300\sim400$ 目; 洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 100:1,V/V)柱层析纯化,得化合物 1(10.4 mg)、6(15.1 mg)。

Fr.C 经正相硅胶柱层析(硅胶: 200~300 目; 洗脱剂: 石油醚-乙酸乙酯 20:1~1:1, *V/V*) 梯度洗脱得到 Fr.C1~C4。Fr.C2~C4 经反复正相硅胶、Sephadex LH-20(二氯甲烷-甲醇 1:1, *V/V*)、 Toyopearl HW-40F(二氯甲烷-甲醇 1:1, *V/V*)、 ODS(甲醇-水80:20~95:5, *V/V*)柱层析纯化,最终得到化合物 2(11.8 mg)、3(13.2 mg)、4(2.9 mg)、5(11.3 mg)、8(6.3 mg)、11(5.3 mg)。

Fr.D 经 MCI 柱层析,乙醇-水(30:70,40:60,50:50,60:40,70:30,80:20,90:10,100:0,V/V)梯度洗脱得到 Fr.D1~D8。Fr.D2 减压浓缩并放至室温后析出少量难溶性粉末状沉淀,过滤沉淀备用,滤液经正相硅胶柱层析(硅胶:300~400 目;洗脱剂:二氯甲烷-甲醇 20:1,V/V)得 6 个组分,其中 Fr.D2.3~D2.4 经反复 Sephadex LH-20(甲醇)、ODS(甲醇-水 30:70~60:40,V/V)、Toyopearl HW-40F(甲醇)纯化,得化合物 7(7.2 mg)、12(12.3 mg)。Fr.D4 经正相硅胶柱层析(硅胶:300~400 目;洗脱剂:二氯甲烷-甲醇 10:1~2:1,V/V)得 9 个组分,其中 Fr.D4.5 依次经 Sephadex LH-20(甲醇)、半制备 HPLC [22%甲醇-水溶液洗脱]得化合物 14(3.8 mg)、15(4.1 mg)。

Fr.F 经 Sephadex LH-20 凝胶柱色谱(甲醇)得到 Fr.F1~F6, 其中 Fr.F2 经 Sephadex LH-

20 凝胶柱色谱(甲醇)得 Fr.F2.1~F2.2。Fr.F2.2 经反复正相硅胶(硅胶: 300~400 目; 洗脱剂: 二氯甲烷-甲醇 10:1~2:1, *V/V*)、Sephadex LH-20(甲醇)、Toyopearl HW-40F(甲醇)柱层析纯化,得化合物 **9**(19.0 mg)、**10**(95.9 mg)、**13**(5.5 mg)。

2.2 抗炎活性测试

安全浓度考察: 采用 CCK-8 法考察各化合物的安全浓度,分别给予不同浓度的化合物溶液作用于 RAW 264.7 细胞 24 h 后检测细胞活力,通过细胞存活率确定化合物的安全浓度范围。

取对数生长期 RAW 264.7 细胞(调整细胞浓度为每毫升 3×10^5 个)接种于 96 孔板中,每孔 $100~\mu$ L,实验设置空白对照组、模型组、地塞米松组(阳性药组)和药物组(待测化合物),每组设置 3 个平行孔,于培养箱中培养 24 h。细胞同时用 $0.25~\mu$ g·mL-1 LPS 和不同浓度梯度的待测化合物刺激 24 h 后,收集上清液,按照试剂盒说明书检测方法测定 NO 的含量,计算 NO 释放抑制率。

3 结果与分析

3.1 结构鉴定

化合物 1 白色无定型粉末,易溶于氯仿、吡啶、DMSO,难溶于甲醇、丙酮。HR-ESI-MS m/z: 899.803 5 [M+Na]⁺ (C₅₆H₁₀₈O₆Na, 理论值: 899.803 8), 结合 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 推测分子式为 C₅₆H₁₀₈O₆。 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) 谱显示 108 个质子信号, 从低场 至高场区依次为 1 个次甲基质子信号[δ: 5.24 (1H, m, H-2)]、49 个亚甲基质子信号[δ: 4.27 (2H, dd, *J* = 12.0, 4.8 Hz, H-1a, 3a), 4.12 (2H, dd, *J* = 12.0, 6.0 Hz, H-1b, 3b), 2.29 (6H, m, H-2', 2", 2"'), 1.58 (6H, m, H-3', 3", 3"'), 1.24 (82H, overlap, H-4'-17', 4"-16", 4"'-17"')]、3 个甲基质 子信号[δ : 0.85 (9H, t, J = 6.8 Hz, H-18′, 17″, 18″′)]。由 ¹³C-NMR 和 HMQC 谱推测,该结构 中包含 3 个羰基碳信号[δ: 173.3 (C-1', 1"'), 172.9 (C-1")]、2 个连氧亚甲基碳信号[δ: 62.1 (C-1,3)]、1个连氧次甲基碳信号[δ : 68.8 (C-2)]、3个甲基碳信号[δ : 14.1 (C-18', 17", 18"')],余 下碳信号为亚甲基信号。该化合物的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据与文献(Abdulmumeen et al., 2017) 报道的化合物 1,2,3-propanetriyl tris(hexadecanoate)相似, 区别仅在于化合物 1 高 场区多 5 个-CH₂-信号。综合 HR-ESI-MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 数据分析,推测化合物为 2-(heptadecanoyloxy)propane-1,3-diyl distearate . 文 献 检 索 未 发 现 (heptadecanoyloxy)propane-1,3-diyl distearate 的核磁数据,通过 HMQC 和 HMBC 进一步确证 该化合物的结构, 见图 2 和表 1。HMBC 谱显示, H-1b/C-1'、H-3b/C-1"、H-1a/C-1'、H-3a/C-1"、H-1b/C-2 和 H-3b/C-2 可确证并归属甘油三脂基本骨架。H-2', 2", 2"'分别与 C-1', 1", 1"'相关, H-3', 3", 3"'分别与 C-1', 1", 1"'和 C-4', 4", 4"相关, H-18', 17", 18"'分别与 C-17', 16", 17""和 C-16', 15",16""相关,可确证烷烃片段的连接并归属其核磁数据。

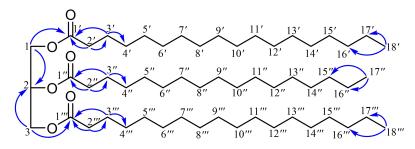


图 2 化合物 1 主要的 HMBC 相关

Fig.2 Key HMBC correlations of Compound 1

位置 Position	$\delta_{ m H}$	$\delta_{ m C}$
1, 3	4.27 (2H, dd, J = 12.0, 4.8 Hz)	62.1×2
*	4.12 (2H, dd, J = 12.0, 6.0 Hz)	_
2	5.24 (1H, m)	68.8
1′,1‴	<u> </u>	173.3×2
1"	_	172.9
2", 2', 2"'	2.29 (6H, m)	34.2, 34.0×2
3", 3', 3"'	1.58 (6H, m)	24.9, 24.8×2
4', 4", 4"'		29.1×3
5', 5", 5"'	1.24 (82H, overlap)	29.4×3
6', 6", 6"'		29.3×3
7', 7'', 7'''		29.7×3
8', 8", 8"'		29.5×3
9'-15', 9"-14", 9"'-15"		29.7×20
16', 15",16"''		31.9×3
17', 16",17"'		22.7×3
18′ 17″ 18‴	0.85(9H + J = 6.8 Hz)	14 1×3

表 1 化合物 1 的 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)和 ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)数据 Table 1 ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) of Compound 1

化合物 2 透明油状物。HR-ESI-MS m/z: 327.217 7 [M-H]⁻ ($C_{18}H_{31}O_{5}$, 理论值: 327.217 7) ,分子式为 $C_{18}H_{32}O_{5}$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, $CD_{3}OD$) δ : 5.57 (2H, m, H-10, 11), 5.41 (1H, m, H-16), 5.35 (1H, m, H-15), 3.89 (1H, dd, J=10.8, 6.0 Hz, H-9), 3.79 (1H, t, J=4.8 Hz, H-13), 3.27 (1H, m, H-12), 2.19 (1H, m, H-14a), 1.97 (2H, m, H-17), 1.92 (1H, m, H-14b), 1.88 (2H, m, H-2), 1.39 (2H, m, H-4), 1.32 (2H, m, H-8), 1.25 (2H, m, H-3), 1.21 (6H, m, H-5, 6, 7), 0.90 (3H, t, J=7.8 Hz, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, $CD_{3}OD$) δ : 177.1 (C-1), 134.5 (C-10), 131.8 (C-15), 129.8 (C-11), 126.7 (C-16), 74.0 (C-12), 73.7 (C-13), 70.7 (C-9), 38.0 (C-2), 37.4 (C-8), 30.2 (C-14), 29.2 (C-5), 29.1 (C-6, 7), 26.3 (C-4), 24.9 (C-3), 20.2 (C-17), 14.2 (C-18)。 以上数据与文献(李帅等,2003)报道基本一致,故鉴定为9,12,13-三羟基-10,15-十八碳二烯酸。

化合物 3 淡黄色粉末。HR-ESI-MS m/z: 341.233 1 [M-H] ($C_{19}H_{33}O_{5}$,理论值:341.232 3),分子式为 $C_{19}H_{34}O_{5}$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, $CD_{3}OD$) δ : 5.69 (2H, m, H-10, 11), 5.45 (2H, m, H-15, 16), 4.06 (1H, m, H-9), 3.95 (1H, m, H-12), 3.64 (3H, s, -OCH₃), 3.45 (1H, m, H-13), 2.31 (3H, m, H-2, 14a), 2.08 (3H, m, H-14b, 17), 1.59 (2H, m, H-3), 1.49 (2H, m, H-8), 1.32 (8H, s, H-4, 5, 6, 7), 0.96 (3H, t, J = 7.6 Hz, H-18); ¹³C-NMR (100 MHz, $CD_{3}OD$) δ : 176.0 (C-1), 136.5 (C-10), 134.3 (C-15), 131.1 (C-11), 126.4 (C-16), 75.9 (C-12), 75.8 (C-13), 73.0 (C-9), 52.0 (-OCH₃), 38.3 (C-8), 34.8 (C-2), 31.5 (C-14), 30.6 (C-7), 30.4 (C-6), 30.2 (C-5), 26.5 (C-4), 26.0 (C-3), 21.7 (C-17), 14.6 (C-18)。以上数据与文献(杨炳友等,2017)报道基本一致,故鉴定为9,12,13-三 羟基-10,15-十八碳二烯酸甲酯。

化合物 4 黄色油状物。HR-ESI-MS m/z: 395.331 6 [M+H]⁺($C_{28}H_{43}O$,理论值: 395.330 8),分子式为 $C_{28}H_{42}O$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 7.45 (2H, d, J = 8.8 Hz, H-6, 6′), 7.45 (2H, d, J = 2.4 Hz, H-3, 3′), 7.21 (2H, dd, J = 8.8, 2.4 Hz, H-5, 5′), 1.33 (18H, s, H-12-14, H-12′-14′), 1.30 (18H, s, H-8-10, H-8′-10′); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 149.1 (C-2, 2′), 148.8 (C-1, 1′), 139.9 (C-4), 139.8 (C-4′), 125.9 (C-3, 3′), 125.2 (C-5, 5′), 120.0 (C-6, 6′), 35.9 (C-7, 7′), 35.5 (C-11, 11′), 31.8 (C-8-10, 8′-10′), 30.8 (C-12-14, 12′-14′)。以上数据与文献(Cao et al., 2020)报道基本一致,故鉴定为 2,2′-氧代双(1,4-二叔丁苯)。

化合物 **5** 黄色粉末。HR-ESI-MS m/z: 269.045 5 [M-H]⁻($C_{15}H_9O_5$,理论值: 269.045 6),分子式为 $C_{15}H_1O_5$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 12.03 (1H, s, 1-OH), 11.96 (1H, s, 8-OH), 11.27 (1H, s, 6-OH), 7.46 (1H, s, H-4), 7.13 (1H, s, H-2), 7.10 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 6.57 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-7), 2.40 (3H, s, -CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 189.6 (C-9), 181.2 (C-10), 165.5 (C-6), 164.4 (C-8), 161.4 (C-1), 148.2 (C-3), 135.0 (C-10a), 132.7 (C-4a),

124.1 (C-2), 120.4 (C-4), 113.3 (C-9a), 108.9 (C-8a), 108.7 (C-5), 107.9 (C-7), 21.5 (-CH₃)。以上数据与文献(Kharlamova, 2007)报道基本一致,故鉴定为大黄素。

化合物 6 黄色粉末。HR-ESI-MS m/z: 253.050 6 [M-H]⁻($C_{15}H_9O_4$,理论值: 253.049 5),分子式为 $C_{15}H_{10}O_4$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.79 (1H, dd, J = 8.4, 7.6 Hz, H-6),7.69 (1H, dd, J = 7.6, 1.2 Hz, H-5),7.53 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-4),7.37 (1H, dd, J = 8.4, 1.2 Hz, H-7),7.20 (1H, d, J = 1.2 Hz, H-2); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ : 191.6 (C-9),181.4 (C-10),161.5 (C-8),161.3 (C-1),149.1 (C-3),137.3 (C-6),133.3 (C-10a),133.0 (C-4a),124.4 (C-2),124.0 (C-7),120.5 (C-4),119.3 (C-5),115.8 (C-8a),113.7 (C-9a),21.6 (-CH₃)。以上数据与文献(Zhou et al., 2006)报道基本一致,故鉴定为大黄酚。

化合物 7 白色粉末。HR-ESI-MS m/z: 393.187 9 [M+Na]⁺($C_{19}H_{30}O_{7}Na$,理论值:393.188 4),分子式为 $C_{19}H_{30}O_{7}$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 5.87 (1H, s, H-4), 5.77 (1H, dd, J=15.2, 6.4 Hz, H-8), 5.63 (1H, dd, J=15.2, 9.2 Hz, H-7), 4.38 (1H, m, H-9), 3.81 (1H, dd, J=11.6, 2.0 Hz, H-6' α), 3.65 (1H, dd, J=11.6, 5.2 Hz, H-6' β), 2.67 (1H, d, J=9.2, H-6), 2.42 (1H, d, J=16.8, H-2 α), 2.04 (1H, d, J=16.8, H-2 β), 1.93 (3H, d, J=0.8, H-13), 1.28 (3H, d, J=6.4, H-10), 1.00 (3H, s, H-11), 1.02 (3H, s, H-12); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 202.0 (C-3), 165.8 (C-5), 138.2 (C-8), 128.8 (C-7), 126.1 (C-4), 102.4 (C-1), 78.1 (C-5), 78.0 (C-3), 77.0 (C-9), 75.2 (C-2), 71.5 (C-4), 62.7 (C-6), 56.7 (C-6), 37.1 (C-1), 28.0 (C-12), 27.6 (C-16), 23.8 (C-13), 21.0 (C-10)。以上数据与文献(彭冰等,2014)报道基本一致,故鉴定为(6R,9R)-3-酮- α -紫罗兰醇-9-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。

化合物 **8** 白色粉末。HR-ESI-MS m/z: 503.260 7 [M+Na]⁺ ($C_{26}H_{40}O_{8}Na$,理论值: 503.261 5),分子式为 $C_{26}H_{40}O_{8}$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, $C_{5}D_{5}N$) δ : 7.15 (1H, t, J = 1.6 Hz, H-14), 4.90 (1H, s, H-17b), 4.83 (1H, d, J = 7.6 Hz, H-1′), 4.72 (1H, s, H-17a), 4.33 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-19b), 3.49 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-19a), 1.19 (3H, s, 18-CH₃), 0.64 (3H, s, 20-CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, $C_{5}D_{5}N$) δ : 174.6 (C-16), 148.2 (C-8), 145.4 (C-14), 134.2 (C-13), 107.0 (C-17), 105.5 (C-1′), 78.8 (C-3′), 78.4 (C-5′), 75.4 (C-2′), 72.6 (C-19), 71.8 (C-4′), 70.6 (C-15), 62.9 (C-6′), 56.7 (C-9), 56.2 (C-5), 39.8 (C-4), 39.1 (C-1), 38.8 (C-7), 38.7 (C-10), 36.4 (C-3), 28.2 (C-18), 25.0 (C-12), 24.7 (C-6), 22.1 (C-11), 19.4 (C-12), 15.5 (C-20)。以上数据与文献(Sun et al., 2019)报道基本一致,故鉴定为新穿心莲内酯。

化合物 9 白色粉末。HR-ESI-MS m/z: 217.068 0 [M+Na]⁺($C_7H_{14}O_6Na$,理论值:217.068 3),分子式为 $C_7H_{14}O_6$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 4.02 (1H, d, J = 4.0 Hz, H-3), 3.88 (1H, dd, J = 6.4, 4.4 Hz, H-4), 3.83 (1H, m, H-5), 3.73 (1H, t, J = 3.2 Hz, H-1a), 3.69 (1H, s, H-1b), 3.62 (2H, m, H-6), 3.30 (3H, s, -OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 109.2 (C-2), 84.6 (C-5), 82.5 (C-3), 78.9 (C-4), 62.8 (C-6), 60.5 (C-1), 48.9 (-OCH₃)。以上数据与文献(尹宏权等,2006)报道基本一致,故鉴定为甲基- α -D-呋喃果糖苷。

化合物 **10** 白色固体。HR-ESI-MS m/z: 343.121 6 [M+H]⁺ ($C_{12}H_{23}O_{11}$, 理论值: 343.123 5),分子式为 $C_{12}H_{22}O_{11}$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, CD_3OD) δ : 4.87 (1H, overlap, H-1), 4.13 (2H, overlap, H-4, 5), 4.01 (1H, overlap, H-3), 3.90 (2H, overlap, H-2', 3'), 3.78 (2H, overlap, H-6b, 6'b), 3.74 (2H, overlap, H-4', 5'), 3.63 (1H, overlap, H-1), 3.45 (2H, overlap, H-6a, 6'a); ¹³C-NMR (100 MHz, CD_3OD) δ : 102.8 (C-2), 99.0 (C-1'), 82.5 (C-5), 77.1 (C-4), 76.2 (C-3), 71.3 (C-2'), 70.8 (C-5'), 69.0 (C-3'), 65.5 (C-4'), 64.2 (C-1, 6'), 63.8 (C-6)。以上数据与文献(Ye et al., 2020)报道基本一致,故鉴定为 1-O- β -D-吡喃果糖- α -D-吡喃阿洛糖苷。

化合物 **11** 白色粉末。HR-ESI-MS m/z: 163.039 1 [M-H]⁻(C₉H₇O₃,理论值: 163.040 1),分子式为 C₉H₈O₃。 ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 7.49 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-3, 5), 7.47 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-7), 6.79 (2H, d, J = 8.4 Hz, H-2, 6), 6.29 (1H, d, J = 16.2 Hz, H-8);

 13 C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 168.4 (C-9), 159.6 (C-4), 143.7 (C-7), 132.0 (C-6), 130.0 (C-2), 125.4 (C-1), 115.8 (C-3, 5), 114.9 (C-8)。以上数据与文献(屈珅玥等,2020)报道基本一致,故鉴定为对香豆酸。

化合物 12 白色粉末。HR-ESI-MS m/z: 367.135 7 [M+Na]⁺($C_{16}H_{24}O_{8}Na$,理论值:367.136 3),分子式为 $C_{16}H_{24}O_{8}$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 6.15 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-5), 6.13 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-3), 4.43 (1H, d, J = 7.8 Hz, H-1'), 3.83 (1H, dd, J = 12.0, 2.4 Hz, H-6'a), 3.78 (1H, dd, J = 12.0, 4.2 Hz, H-6'b), 3.49 (2H, overlap, H-7, 4'), 3.47 (1H, overlap, H-2'), 3.42 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-3'), 3.24 (1H, m, H-5'), 1.58 (1H, m, H-8a), 1.50 (1H, m, H-8b), 1.08 (3H, d, J = 7.2 Hz, H-10), 0.87 (3H, t, J = 7.2 Hz, H-9); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 156.1 (C-4), 151.5 (C-6), 143.9 (C-2), 138.2 (C-1), 108.2 (C-1'), 104.7 (C-3), 102.1 (C-5), 78.4 (C-5'), 78.2 (C-3'), 75.6 (C-2'), 71.0 (C-4'), 62.2 (C-6'), 33.7 (C-7), 31.5 (C-8), 22.2 (C-10), 12.6 (C-9)。以上数据与文献(Sahai et al., 1994)报道基本一致,故鉴定为 cesternosides A。

化合物 **13** 白色粉末。HR-ESI-MS m/z: 355.099 0 [M+Na]⁺($C_{14}H_{20}O_{9}Na$,理论值:355.099 9),分子式为 $C_{14}H_{20}O_{9}$ 。 ¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_{6}) δ : 7.72 (1H, s, 4-OH), 6.38 (2H, s, H-2, 6), 4.67 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1'), 3.71 (6H, s, 2×-OCH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_{6}) δ : 150.2 (C-4), 148.1 (C-2, 6), 130.5 (C-1), 101.6 (C-1'), 95.3 (C-3, 5), 77.0 (C-5'), 76.7 (C-3'), 73.2 (C-2'), 70.1 (C-4'), 60.8 (C-6'), 55.8 (2×-OCH₃)。以上数据与文献(Wu et al., 2013)报道基本一致,故鉴定为 koaburaside。

化合物 **14** 黄色粉末。HR-ESI-MS m/z: 471.089 0 [M+Na]⁺($C_{21}H_{20}O_{11}$ Na,理论值:471.089 8),分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。 ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.18 (1H, s, 5-OH), 7.53 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-6'), 7.47 (1H, s, H-2'), 6.85 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5'), 6.63 (1H, s, H-3), 6.25 (1H, s, H-6), 4.68 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-1''); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 182.0 (C-4), 164.0 (C-2), 162.2 (C-7), 160.4 (C-5), 156.0 (C-9), 149.9 (C-4'), 145.9 (C-3'), 121.8 (C-1'), 119.4 (C-6'), 115.7 (C-5'), 114.0 (C-2'), 104.6 (C-8, 10), 102.4 (C-3), 98.2 (C-6), 82.0 (C-5''), 78.8 (C-3''), 73.4 (C-1''), 70.8 (C-2''), 70.7 (C-4''), 61.7 (C-6'')。以上数据与文献(吴洪新等,2009)报道基本一致,故鉴定为荭草素。

化合物 **15** 黄色粉末。HR-ESI-MS m/z: 471.089 4 [M+Na]⁺($C_{21}H_{20}O_{11}$ Na,理论值:471.089 8),分子式为 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 。 ¹H-NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 13.57 (1H, s, 5-OH), 7.42 (1H, dd, J = 8.4, 2.4 Hz, H-6′), 7.40 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2′), 6.89 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5′), 6.68 (1H, s, H-3), 6.48 (1H, s, H-8), 4.58 (1H, d, J = 9.6 Hz, H-1″); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 181.9 (C-4), 163.7 (C-2), 163.3 (C-7), 160.7 (C-5), 156.2 (C-9), 149.7 (C-4′), 145.8 (C-3′), 121.4 (C-1′), 119.0 (C-6′), 116.1 (C-5′), 113.3 (C-2′), 108.9 (C-6), 103.4 (C-10), 102.8 (C-3), 93.5 (C-8), 81.6 (C-5″), 79.0 (C-3″), 73.0 (C-1″), 70.6 (C-2″), 70.2 (C-4″), 61.5 (C-6″)。以上数据与文献(吴洪新等,2009)报道基本一致,故鉴定为异荭草素。

图 3 化合物 1-15 化学结构式

Fig.3 Chemical structures of compounds 1–15

3.2 抗炎活性测试结果

CCK-8 细胞毒性测试结果显示,化合物 1-4、6-15 在 25 μ mol·L·l 时,化合物 5 在 12.5 μ mol·L·l 时无明显毒性,故选择相应浓度下进行 NO 抑制活性实验。由表 2 可知,化合物 1-3(脂肪酸及其衍生物)、化合物 8(二萜类)、化合物 1-15(酚类)显示出一定的 NO 释放抑制活性,表明这些成分具有一定的抗炎活性,可能是蛇含委陵菜抗炎活性物质。

表 2 化合物 1-15 的 NO 释放抑制率 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 NO production inhibition rate of compounds 1–15 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

化合物 Compound	浓度 Concentration(μmol·L ⁻¹)	抑制率 Inhibition rate (%)
1	25	50.3 ± 2.1
2	25	56.2 ± 1.3
3	25	58.6 ± 1.5
4	25	18.9 ± 2.5
5	12.5	10.8 ± 1.8
6	25	25.5 ± 3.1
7	25	28.3 ± 2.3
8	25	72.5 ± 2.7
9	25	12.2 ± 2.9
10	25	18.5 ± 2.5
11	25	58.0 ± 1.6
12	25	63.8 ± 1.1
13	25	66.4 ± 1.3
14	25	62.5 ± 1.2
15	25	55.0 ± 1.9
地塞米松 Dexamethasone	25	81.5 ± 1.2

4 讨论与结论

蛇含委陵菜是贵州苗族、侗族等少数民族习用药材,主要用于风湿性关节炎、乳腺炎、肺炎等疾病的治疗。目前,蛇含委陵菜的化学成分及其抗炎活性研究较少。该研究从蛇含委陵菜 60%乙醇提取物中分离得到 15 个化合物,均首次从委陵菜属植物中分离得到,包括脂肪酸衍生物(1-3)、二苯醚类化合物(4)、蒽醌类化合物(5,6)、萜类化合物(7,8)、苯丙素类化合物(11)、酚苷类化合物(12,13)、黄酮苷类化合物(14,15)及其他(9,10)。

脂多糖可诱导巨噬细胞 NF-κB 信号通路的激活,从而促进炎症因子的释放和 NO 的合成,而 NO 又与 AMPK/ NF-κB、TLR/ NF-κB 等通路的调节密切相关(安莉和孙丕忠,2020)。因此,本研究采用 LPS 诱导的小鼠巨噬细胞(RAW 264.7)体外炎症模型,通过测定 NO 释放抑制率来评价化合物的抗炎活性。抗炎结果表明化合物 1-3(脂肪酸及其衍生物)、化合物 8(二萜类)、化合物 11-15(酚性成分)具有一定的抗炎活性,其中新穿心莲内酯(8)在 25 μmol·L·l·浓度下抑制率为 72.5%。据文献报道,碳十八碳烷酸及其衍生物大多具有较好的抗炎活性(张俊卿等,2021),化合物 1-3 可能通过参与 NF-κB 激活的调节、影响膜磷脂组成和脂质微结构域功能的改变从而产生抗炎作用,反相调节 NO 释放(Allijn et al., 2019)。新穿心莲内酯(8)对 NO 释放具有显著的抑制作用,其可能通过清除 NO 自由基,阻断信号传递而产生抗炎作用(刘峻和王峥涛,2005),提示该化合物具有抗炎及免疫调节作用,具有作为抗炎先导化合物进行结构修饰的潜在价值。荭草素(14)和异荭草素(15)能够有效减少 LPS 诱导的炎性因子释放(NO、TNF-α 以及 IL-1β),抑制 MAPK 家族激酶及 NF-κB 等上游信号通路相关蛋白活化,降低促炎因子的表达,从而抑制炎症反应(罗成等,2016;万思琦等,2018)。各类物质的抗炎作用机制不尽相同,通过多成分协同发挥抗炎作用。

本研究进一步丰富了蛇含委陵菜的植物化学信息及化合物结构类型,明确了脂肪酸衍生物、二萜及酚性成分是其潜在的抗炎物质,为深入探索蛇含委陵菜的化学成分及抗炎机制奠定了基础,也为该药用植物的进一步开发利用提供科学依据。

参考文献:

- ABDULMUMEEN AH, OLAPEJU OA, FATIMA K, et al., 2017. Isolation, characterization and antiproliferative evaluation of constituents from stem extracts of *Alafia barteri* Oliv. Hook. F. [J]. Med Chem Res, 26(12): 3407-3416.
- ALLIJN IE, BRINKHUIS P, STORM G, et al., 2019. Anti-inflammatory properties of plant derived natural products-a systematic review[J]. Curr Med Chem, 26(24): 4506-4536.
- AN L, SUN PZ, 2020. Effects of artemisinin on activation of NF-κB signaling pathway and NO synthesis in mouse macrophages induced by LPS[J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci), 55(4): 504-508. [安莉,孙丕忠,2020. 青蒿素对脂多糖诱导的小鼠巨噬细胞 NF-κB 信号通路激活和 NO 合成的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),55(4): 504-508.]
- CAO J, YANG JN, ZHOU XQ, et al., 2020. Chemical constituents of *Psychotria hainanensis*[J]. Chem Nat Compd, 56(3): 533-534.
- Editorial committee of Quality Standard of Guizhou Traditional Chinese medicine and ethnic Medicine, 2003. Quality standards for Chinese medicinal materials and ethnic medicinal materials in Guizhou Province[S]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 85. [贵州省中药材、民族药材质量标准编审委员会, 2003. 贵州省中药材、民族药材质量标准[S]. 贵阳:贵州科技出版社: 85.]

- Editorial Committee of Flora Reipublicae Popularis Sinicae, CAS, 1985. Flora Reipublicae Popularis Sinicae (Volume 37) [M]. Beijing: Science Press: 315. [中国科学院中国植物志编辑委员会, 1985. 中国植物志(第 37 卷)[M]. 北京: 科学出版社: 315.]
- HUANG YA, 2008. Studies on chemical constituent and antibacterial activity of *Potentilla kleiniana* Wight.et Arn. [D]. Guiyang: Guizhou university. [黄易安, 2008. 蛇含委陵菜的化学成分及抑菌活性研究[D]. 贵阳:贵州大学.]
- KHARLAMOVA TV, 2007. Reaction of frangula-emodin with α -bromoalkylmethylketones[J]. Chem Nat Compd, 43(4): 391-394.
- LUO YC, SUN QW, 2013. Natural medicines commonly used in Guizhou (Volume 2) [M]. Guiyang: Guizhou Science and Technology Press: 82-83. [罗迎春,孙庆文,2013. 贵州民族常用天然药物(第 2 卷)[M]. 贵阳:贵州科技出版社: 82-83.]
- LI SH, WU XJ, LIU YY, et al., 2011. Chemical constituents in *Potentilla kleiniana*[J]. Chin Trad Herb Drugs, 42(11): 2200-2203. [李胜华, 伍贤进, 牛友芽, 等, 2011. 蛇含委陵菜化学成分研究[J]. 中草药, 42(11): 2200-2203.]
- LI SH, WU XJ, ZENG JY, et al., 2014. Antihyperglycemic effect of total flavonoids from *Potentilla kleiniana* Wight et Arn. *in vitro* and *in vivo*[J]. Food Sci, 35(11): 246-250. [李胜华, 伍贤进, 曾军英, 等, 2014. 蛇含委陵菜总黄酮的体外和体内降血糖效果研究[J]. 食品科学, 35(11): 246-250.]
- LI S, KUANG HX, OKADA Y, et al., 2003. Studies on chemical constituents of *Bidens bipinnata* (I)[J]. Chin Trad Herb Drugs, 34(9): 782-785. [李帅, 匡海学, 冈田嘉仁, 等, 2003. 鬼针草化学成分的研究(I)[J]. 中草药, 34(9): 782-785.]
- LIU MZ, HUANG XQ, LIU Q, et al., 2019. Separation of α-glucosidase inhibitors from *Potentilla kleiniana* Wight et Arn. using solvent and flow-rate gradient high-speed counter-current chromatography target-guided by ultrafiltration HPLC-MS screening[J]. Phytochem Anal, 30(6): 661-668.
- LIU J, WANG ZT, 2005. Effect of neoandrographolide on activated mouse macrophages *in vitro*[J]. Chin J Nat Med, 3(5): 308-311. [刘峻,王峥涛,2005. 新穿心莲内酯对体外活化小鼠巨噬细胞的影响[J]. 中国天然药物,3(5): 308-311.]
- LIU T, LIAO XF, WU YT, et al., 2021. Research progress on anti-inflammatory effective components and mechanism of *Artemisiae argyi folium*[J]. Trad Chin Drug Res Clin Pharmacol, 32(3): 449-454. [刘涛,廖晓凤,吴燕婷,等,2021. 艾叶有效成分抗炎作用及其机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理,32(3): 449-454.]
- LUO C, LI Y, LONG JG, et al., 2016. Pharmacological effects of isoorientin[J]. Space Med Med Eng, 29(5): 381-384. [罗成,李艳,龙建纲,等,2016. 异荭草素的药理作用[J]. 航天医学与医学工程,29(5): 381-384.]
- PENG B, GAO ZP, HE W, et al., 2014. A new chromone glycoside from *Dryopteris fragrans* (II)[J]. Chin Trad Herb Drugs, 45(15): 2136-2138. [彭冰, 高增平, 何薇, 等, 2014. 香鳞毛蕨中 1个新的色原酮苷(II)[J]. 中草药, 45(15): 2136-2138.]
- QU SY, WEI XD, SAI M, et al., 2020. Chemical constituents from *Rhodiola crenulate*[J]. Chin Trad Pat Med, 42(12): 3199-3023. [屈珅玥,魏小东,赛曼,等,2020. 大花红景天化学成分的研究[J]. 中成药,42(12): 3199-3023.]
- SUN XW, YAN HJ, ZHANG YJ, et al., 2019. Preparative separation of diterpene lactones and flavones from *Andrographis paniculate* using off-line two-dimensional high-speed countercurrent chromatography[J]. Molecules, 24(3): 620.

- WAN SQ, LIU LY, LIU MS, et al., 2018. A study on the pharmacological mechanism of orientin [J]. J Med Res, 47(6): 183-186. [万思琦,刘立亚,刘梦思,等,2018. 荭草苷的药理作用机制研究[J]. 医学研究杂志,47(6): 183-186.]
- WUBSHET SG, BRIGHENTE IMC, MOADDEL R, et al., 2015. Magnetic ligand fishing as a targeting tool for HPLC-HRMSSPE-NMR: α-glucosidase inhibitory ligands and alkylresorcinol glycosides from *Eugenia catharinae*[J]. J Nat Prod, 78(11): 2657-2665.
- WU Q, BANG MH, CHO JG, et al., 2013. Phenolic compounds from the roots of *Brassica rapa* ssp. *campestris*[J]. Chem Nat Compd, 49(5): 852-856.
- WU HX, WEI XY, FENG SX, et al., 2009. A study on the flavonoids of *Lespedeza hedysaroides* [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 29(9): 1905-1908. [吴洪新,魏孝义,冯世秀,等,2009. 尖叶胡枝子黄酮类化学成分的研究[J]. 西北植物学报,29(9): 1905-1908.]
- YANG BY, LU ZK, LIU Y, et al., 2017. Isolation and identification of chemical constituents from stems of *Datura metel*[J]. Chin J Exp Trad Med Form, 23(17): 34-40. [杨炳友,卢震坤,刘艳,等,2017. 洋金花茎化学成分的分离鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,23(17):34-40.]
- YIN HQ, FU HW, HUA HM, et al., 2006. Chemical constituents of *Saussurea lappa* C.B Clarke[J]. J Shenyang Pharm Univ, 23(10): 641-643. [尹宏权,付红伟,华会明,等,2006. 云木香的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,23(10): 641-643.]
- YE C, JIN M, JIN CS, et al., 2020. Inhibitory effects of chemical constituents from *Actinidia kolomikta* on LPS-induced inflammatory responses[J]. Rev Bras Farmacogn, 30(1): 127-131.
- ZHOU X, SONG BA, JIN LH, et al., 2006 Isolation and inhibitory activity against ERK phosphorylation of hydroxyanthraquinones from rhubarb[J]. Bioorg Med Chem Lett, 16(3): 563-568.
- ZHANG CG, ZHOU J, WANG S, et al., 2018. Anti-inflammatory and antibacterial activity of *Potentilla kleiniana* ethyl alcohol extractive[J]. Cent South Pharm, 16(11): 1547-1552. [张晨光,周晶,王珊,等,2018. 蛇含委陵菜乙醇提取物的抗炎及抑菌活性研究[J]. 中南药学,16(11): 1547-1552.]
- ZHANG JQ, LI JK, WANG Y, et al., 2021. Steroids constituents from *Codonopsis pilosula* and their anti-inflammatory activities[J]. Chin Trad Pat Med, 43(1): 92-97. [张俊卿,李建宽,王妍,等,2021. 潞党参甾体类成分及其抗炎活性[J]. 中成药,43(1): 92-97.]